

高血圧自然発症ラットにおける細胞膜  
 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性についての研究

大学院医学研究科内科系専攻（内科学1）

稲荷場ひろみ

主科目担当および指導教授

武田忠直 教授

緒言:

1960年以降、本態性高血圧患者の赤血球や白血球内のNaイオン量が増加していることが報告され(1)(2)(3)、高血圧の成因に細胞膜のNaイオン輸送系の異常が関与している可能性が示唆されている。

本態性高血圧患者(4)や本態性高血圧患者のモデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)(5)(6)の赤血球ではNaイオンの細胞内への流入の増加が報告されており、また本態性高血圧患者の赤血球では細胞内からNaイオンのくみだしを行う細胞膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプの活性低下が報告されている(7)。これらの膜を介するイオン輸送の異常が細胞内のNaイオン量の上昇をもたらしていると考えられる。

細胞内へのNaイオン流入経路は単一でなく、拡散輸送および  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交換輸送、  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送、  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 共輸送等の担体輸送が存在する。これらのうち細胞膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系は細胞



内へNaイオンを流入させ細胞外へプロトンイオンを流出させることにより、細胞内のNaイオン量を調節するだけにとどまらず、細胞容量、細胞内pH、細胞増殖、刺激に対する細胞の反応調節に重要な役割を果たしている(8)。最近になって本態性高血圧患者やSHRの赤血球やリンパ球、血小板でこの $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の上昇が報告され(9)(10)(11)、この経路が高血圧の発症、維持に関与している可能性が注目されるようになってきた。

血管平滑筋細胞は患者からの分離が困難なため血球細胞に比し研究が遅れていた。しかし最近、田村らはSHR培養血管平滑筋細胞におけるNaイオンの流入の増加と $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプ活性の上昇を報告し(12)、またMatribらは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交換活性がSHRの培養血管平滑筋細胞で上昇していると報告した(13)。血管平滑筋の $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系については1986年にLittleらがラット培養血管平滑筋細胞の細胞膜に $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系が存在すること、およびこれが

細胞内へのNaイオンの重要な流入経路であることを報告したが(14)、その交換活性と病態としての高血圧との関わりについては十分解明されていない。

そこで本研究ではSHRと正常血圧Wistar-Kyotoラット(WKY)の培養血管平滑筋細胞における細胞膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性を、この交換系の特異的阻害剤であるEthylisopropylamiloride(15)に感受性のNaイオン流入をもって評価した。また $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系に対するprotein kinase Cとcalmodulinの影響を検討した。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の変化は細胞内pHに変化をもたらすことから、血管平滑筋細胞のモデル細胞として、比較的その細胞内pHの測定が容易な血小板を用いて、SHRとWKYで細胞内pHを測定し比較検討した。



実験材料および実験方法:

[ 略語 ]

この論文では以下に示した略語を使用した。

SHR;       spontaneously hypertensive  
             rats

WKY;       Wistar-Kyoto rats

PK-C;       protein kinase C

HEPES;      N-2-hydroxyethylpiperazine-  
             N'2-ethanesulfonic acid

EIPA;       ethylisopropylamiloride

H-7;        1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-  
             methylpiperazine

HA-1004;    N-(2-guanidinoethyl)-5-  
             isoquinolinesulfonamide  
             hydrochloride

W-7;        N-(6-aminohexyl)-5-chloro-  
             1-naphthalenesulfonamide

BCECF-AM;   2'7'-bis(carboxyethyl)carboxy  
             fluorescein tetraacetoxy-  
             methyl ester

#### [ 使用 薬 剤 ]

ウアバイン、HEPES、ウシ血清アルブミン、  
アンギオテンシンⅡはシグマ (St. Louis,  
USA)より購入した。H-7、W-7、HA-1004は生  
化学工業 (東京)、エンドセリン-3 (ラット  
エンドセリン) はペプチド研究所 (大阪)、  
 $^{22}\text{Na}^+$ は E. I. DuPont de Nemours & Co. Inc.  
(Wilmington, DE)より入手した。EIPAは北陸  
大学、生理化学教室の毛利教授より分与され  
た。

#### [ 動 物 ]

本実験は、10から14週齢の雄SHRと雄WKY  
(チャールズリバー、神奈川)を用いて行  
った。ラットは実験の少なくとも1週間前よ  
り約23℃の一定温度で保たれた室内で飼育し、  
ラットの標準飼料を与え、水道水を自由に飲  
ませて飼育した。

#### [ 血 圧 測 定 ]



ラット血圧は tail-cuff 法にて測定した。  
各々の値は各 5 回ずつ測定しその平均をとった。  
血圧の測定は実験の少なくとも 24 時間以前に行った。

#### [ 血管平滑筋細胞の培養 ]

培養血管平滑筋細胞は、ラットの胸部大動脈より Rossらの方法により分離し、10%牛胎児血清（三菱化成、東京）および 25000U/l のストレプトマイシン、ペニシリン（GIBCO, Grand Island, NY）を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) 培地で培養した(16)。すなわち、ペントバルビタール麻酔下のラットを剃毛し胸腹部を消毒した後開胸し、胸部大動脈を無菌的に取り出し抗生剤を含む DMEM にて血液を洗い流し血管周囲の結合織を除いた。得た大動脈片を縦に切開して展開し、内皮細胞は綿棒にてこすりおとし、外膜はピンセットにて中膜を傷つけぬように注意しながら中膜組織より引き剥し

た。得られた中膜組織から、1mmから2mm角の切片を切り出し25mlのカルチャーフラスコ(Farcon 3013)の底面にはりつけ、組織片が剥がれぬように静かに10%牛胎児血清と抗生剤をふくむDMEMをそそぎ、庫内を5%CO<sub>2</sub>, 37℃の条件に保ったCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。培地の交換を行いながら、約2週間培養を続けると中膜片より平滑筋細胞がmigrateしてくる(Fig.1-a)。この細胞を0.25%のトリプシンにて処理し細胞を浮遊状にして遠沈し(200×G, 2min)、沈渣をDMEMにて懸濁し再度カルチャーフラスコに移した。3日から4日に一度の割合で培地の交換を行い培養を続けると、約2週間でコンフルエントな状態となった。コンフルエントになった細胞を位相差顕微鏡で観察すると血管平滑筋細胞に特徴的なhill and valley like patternを確認できた(Fig.1-b)。細胞がコンフルエントになった時点で上記の方法で細胞をフラスコよりはがし血球計算板で細胞数を測



定し、細胞数  $2 \sim 4 \times 10^5$  / フラスコの密度に細胞を撒き、培養を続けた。以後この要領で4から7代まで継代した細胞を直径50mmのカルチャーデッシュ (COSTAR 3060) に  $1 \sim 3 \times 10^5$  個撒いてコンフルエントになった時点で実験に用いた。細胞が血管平滑筋細胞であることの同定は筋細胞のアクチンに特異的な抗体 (anti-muscle actin IgG) (Biomedical Technologies Inc., Staughton, MA, USA) を用いた間接蛍光抗体法によった (17)。その結果、得た細胞の99%以上が平滑筋細胞であることが証明された (Fig. 1-c)。

#### [細胞内へのNa流入の測定]

Naの細胞内への流入はLittleらの方法によって測定した (14)。すなわち、カルチャーデッシュから培養液を除き、2mlのNa-free physiological salt solution (PSS) ( $135\text{mM}$  choline chloride,  $5\text{mM}$  KCl,  $1.8\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.8\text{mM}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $5.5\text{mM}$  glucose,  $50\text{mM}$  HEPES,

pH 7.4) に置き換えて40分間プレインキュベーションを行う。その後、15mM NaCl、 $^{22}\text{Na}^+$  (最終濃度  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ ) 及び2mMウアバインを含むインキュベーション溶液で37℃、5分間インキュベーションを行った。インキュベーション終了時には氷冷した  $\text{MgCl}_2$  にて素早く6回細胞を洗い、細胞表面の  $^{22}\text{Na}^+$  を洗い流した。細胞は0.1N NaOHを加えて採集し遠沈して、その上清の放射活性をガンマシンチレーションカウンター (Packard model Auto Gamma 500C Counting System, Rockville, MD) で測定した。5分間のインキュベーション中の細胞内への  $^{22}\text{Na}^+$  の流入速度はほぼ一定であった (Fig. 2)。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性の評価は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系に特異的な阻害剤であるEIPAを用いて行った。 $1 \times 10^{-7}\text{M}$  から  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  のEIPAをインキュベーション溶液中に加えると  $^{22}\text{Na}^+$  の細胞内への流入は用量依存性に減少し  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  で最大の効果を示した (Fig. 3)。  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  のEIPA存在下では、SHR由来の細胞



で約70%、WKYで約60%の $^{22}\text{Na}^+$ 流入の抑制がみられたが、この結果はラット培養血管平滑筋細胞のNa流入に対するEIPAの作用に関するこれまでの報告とほぼ一致していた(14)。ゆえにEIPA  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 存在下及び非存在下の $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度の差すなわちEIPA感受性 $^{22}\text{Na}^+$ 流入をもって $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介するNaイオンの流入とし $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性を評価した。

[ H-7およびW-7の $^{22}\text{Na}^+$ 流入に対する影響 ]

PK-CとCa-calmodulin系の $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系に対する関与を検討するために各々の阻害剤であるH-7(18)とW-7(19)を用いてEIPA感受性 $^{22}\text{Na}^+$ 流入に対する影響を検討した。各々の阻害剤 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ から $1 \times 10^{-4}\text{M}$ で使用した。各阻害剤はプレインキュベーションの最後の10分間と5分間のインキュベーション中に添加した。またH-7のコントロールとしてHA-1004(20)を用いた。 $^{22}\text{Na}^+$ 流入の変化が阻害剤添加による非特異的な細胞傷害によるもので

ないことを確かめるため実験の前後で細胞形態の変化の有無、細胞の生存率及び細胞上清中のLDHの活性を比較した。細胞の生存率は0.1%のトリパンブルーにより死んだ細胞を染色しこれを血球計算板にてカウントした。LDHの測定はWroblewskiらの方法(21)により行った。

#### [ アンギオテンシンⅡとエンドセリンの

#### $^{22}\text{Na}^+$ 流入に対する影響 ]

SHRとWKYの $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の差異が刺激時にも存在するかどうかをみるためにアンギオテンシンⅡとエンドセリン-3を用いて実験を行った。それぞれ $1 \times 10^{-9}\text{M}$ から $1 \times 10^{-7}\text{M}$ をインキュベーション溶液中に添加し $^{22}\text{Na}^+$ の細胞内への流入に対する影響について検討した。

#### [ たんぱく量の測定 ]

各ディッシュの放射活性をたんぱく量で補正した。細胞数とその細胞を融解したNaOH液



の上清のたんぱく量との間には、細胞数が  $5 \times 10^5$  から  $3 \times 10^6$  個までのあいだで直線関係がみられることを確認した。たんぱく濃度の測定は Bio-Rad protein assay kit を用いて Coomassie blue dye-binding assay 法 (22) にて行った。吸光度は分光光度計 (島津 UV-160) により波長 595nm で測定した。

#### [ 血小板の分離 ]

血小板は遠心法により分離した (23)。ラット体重 1kg あたり 25mg のペントバルビタール腹腔内注射による麻酔下でラットを開腹し、クエン酸を含むディスポーザブルシリンジにて約 10ml の血液を腹部大動脈より採血した。物理的刺激による血小板の活性化を防ぐため注射針は 22G または 21G を使用した。プラスチックチューブ内に抗凝固剤として 3.8% のクエン酸を最終濃度 13mM となるように加えて血液と転倒混和し全血をすみやかに  $200 \times G$ 、15 分間、 $20^\circ C$  で遠沈し platelet rich plasma

(PRP)を得た。PRPをさらに  $700 \times G$ 、20分、 $20^{\circ}C$ で遠沈、沈渣として血小板を得た。沈渣は HEPES 緩衝液 (145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM  $MgSO_4$ , 10mM HEPES, 5mM glucose, 0.01% bovine serum albumin, pH 6.5) で細胞数  $1 \times 10^9/ml$  になるように懸濁した。細胞数の計測はコールター・カウンター (Coulter Electronics, INC. Florida, USA) にて行った。上記方法で得られた血小板浮遊液中の赤血球及び白血球数はともに  $1 \times 10^3/ml$  以下であり血小板浮遊液中の赤血球、白血球混入の影響は無視できると考えられた。

#### [ 細胞内 pH の測定 ]

血小板の細胞内 pH は Rinkらの方法により細胞膜透過性の pH 感受性蛍光色素 BCECF-AM を用いて測定した (24)。血小板浮遊液に最終濃度  $4 \mu M$  となるように BCECF-AM を加え遮光して恒温槽にて攪拌しながら  $37^{\circ}C$  で 20 分間インキュベーションしたのち、 $600 \times G$  で 15 分間遠沈し



て上清を除き HEPES 緩衝液で懸濁した。この過程をもう一度繰り返し細胞外の蛍光色素を除いた。得られた沈渣は 37℃、pH 7.4 の HEPES 緩衝液 1 ml に  $1 \times 10^9$  個になるように懸濁し、37℃で蛍光測定までストックした。pH の測定はこの BCECF を負荷した血小板を  $5 \times 10^7 / \text{ml}$  となるよう pH 7.4 の HEPES 緩衝液で希釈して蛍光分光光度計（日立 650-40）にて励起波長  $500 \pm 5 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $530 \pm 5 \text{ nm}$  で蛍光強度を測定して行った。測定はキュベット内が常に 37℃となるようにし攪拌しながら行った。蛍光強度は連続してチャートに記録したが、約 10 分間で定常状態に達した。単一検体の蛍光強度は少なくとも連続 60 分以内の測定では一定の値を示したが、それ以上になると蛍光強度が徐々に上昇してくる傾向がみられたため、色素を負荷した細胞は 60 分以内に実験に使用した。細胞内 pH のキャリブレーションはナイジェリシン / K 法を用いて行った (25)(26)。すなわち pH の異なる 4 種類のキャリブレイシ

ヨ ン buffer (130mM KCl, 10mM NaCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM Na-MOPS, pH=6.5-7.5) を作成した。ストック溶液中の血小板をこの Buffer で上記のサンプルと同濃度に希釈し、ナイジェリシンを最終濃度 10 μg/ml となるように加え、キュベット内で約 10 分、37℃で攪拌し平衡に達した後、蛍光強度を読み取った。ナイジェリシンは  $(K)_i / (K)_o = (H)_i / (H)_o$  という特性をもつイオノフォアであるため上記の Buffer 中では細胞内外の pH が等しくなる。pH が異なる 4 種のキャリブレーション Buffer についてそれぞれ蛍光強度を測定し標準曲線を作成し検体の細胞内 pH を測定した。

#### [ 統計 ]

成績は平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間の差異の検定には Student's T-test を用いた。試薬添加時のコントロールとの差異の検定には Dunnett の多重比較検定を用いた。



## 実験結果:

### [ 培養血管平滑筋細胞における $^{22}\text{Na}^+$ 流入 ]

Fig. 4-aに示すようにSHRの総 $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度はWKYに比し有意に高値であった( $6.08 \pm 0.16$  vs  $4.13 \pm 0.09$  nmoles/min/mg protein;  $P < 0.001$ ,  $n=14$ )。EIPAに非感受性の $^{22}\text{Na}^+$ 流入には両群間で有意差がみられなかった。  
( $1.83 \pm 0.09$  vs  $1.62 \pm 0.10$  nmoles/min/mg protein;  $P > 0.05$ ,  $n=14$ )。一方、EIPAに感受性の $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度、すなわち $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介する $^{22}\text{Na}^+$ 流入はSHRがWKYに比し有意に高値であった( $4.32 \pm 0.27$  vs  $2.17 \pm 0.14$  nmoles/min/mg protein;  $P < 0.001$ ,  $n=14$ ) (Fig. 4-b)。このようにSHRにおける細胞内への総 $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度の上昇は $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介する $^{22}\text{Na}^+$ 流入の増加によるものであると考えられた。

PK-CとCa-Calmodulinの $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系への関与を検討するためH-7とW-7の作用について

観察した。  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  から  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  の H-7 添加により EIPA 感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度は SHR の培養血管平滑筋細胞で低下する傾向がみられ、  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  では非添加群に比し有意な低下がみられた ( $4.22 \pm 0.23$  vs  $3.36 \pm 0.19$  nmoles/min/mg protein;  $P < 0.05$ ,  $n = 8$ )。  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  の H-7 添加処理後の SHR の EIPA 感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度は WKY の H-7 非添加群の値と有意差がみられなかった ( $3.36 \pm 0.19$  vs  $2.86 \pm 0.22$  nmoles/min/mg protein;  $P > 0.05$ ) (Fig. 5)。すなわち、SHR 培養血管平滑筋細胞では H-7 により PK-C を抑制すると細胞膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系を介する  $^{22}\text{Na}^+$  流入が WKY と同等のレベルまで減少した。H-7 のコントロールとして用いた HA-1004、  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  を添加しても  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度の低下はみられなかった ( $4.22 \pm 0.23$  vs  $4.25 \pm 0.17$  nmoles/min/mg protein;  $P > 0.05$ ,  $n = 8$ )。一方、WKY の培養血管平滑筋細胞では  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  から  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  濃度の H-7 では EIPA 感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度に有意な変化はみられな



かった。

W-7の添加は  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  から  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  までの濃度では、 $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度に対し SHR、WKY いずれにおいても有意な変化を与えなかった (Fig. 6)。

阻害剤添加による細胞傷害に関しては、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  の阻害剤の添加の前後の位相差顕微鏡観察で細胞の形態に変化はなかった。トリパンプルー染色によって検討した細胞の生存率はいずれの阻害剤を用いた場合でも 95% 以上であり阻害剤添加の前後で差はなかった。細胞上清中の LDH 活性は H-7 添加前で  $4.8 \pm 1.2 \text{ WU}$  添加後で  $3.5 \pm 0.8 \text{ WU}$  ( $n=6$ )、W-7 添加前で  $3.8 \pm 1.0 \text{ WU}$ 、添加後  $3.6 \pm 1.5 \text{ WU}$  ( $n=6$ ) と増加はみられなかった。すなわち阻害剤の効果は細胞傷害によるものではないことが確認された。

#### [ アンギオテンシン II とエンドセリンの

#### $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度に対する影響 ]

Fig. 7-a に示すようにアンギオテンシン II

添加により総  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度は SHR、WKY ともに上昇する傾向がみられ、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$  添加時にはそれぞれ添加前値の約 1.5 倍に上昇し、その値は SHR で有意に高値であった ( $8.88 \pm 0.81$  vs  $5.83 \pm 0.29$  nmoles/min/mg protein;  $P < 0.01$ )。このとき EIPA 感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度もまた SHR で WKY に比し有意に高値であった ( $7.11 \pm 0.68$  vs.  $3.98 \pm 0.31$  nmoles/min/mg protein;  $P < 0.01$ ) (Fig. 7-b)。アンギオテンシン II は EIPA 非感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度に影響を与えなかった。

エンドセリン  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  の添加により培養血管平滑筋細胞内への総  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度は SHR、WKY ともに前値の約 1.4 倍に増加し、SHR の値は WKY に比し高値であった ( $9.15 \pm 0.40$  vs  $5.03 \pm 0.54$  nmoles/min/mg protein,  $P < 0.01$ )。EIPA 感受性  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度は SHR、WKY ともに  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  で有意な上昇がみられ、SHR で高値であった ( $7.26 \pm 0.12$  vs  $3.59 \pm 0.53$  nmoles/min/mg protein,  $P < 0.01$ )。EIPA に



非感受性の  $^{22}\text{Na}^+$  流入はエンドセリン刺激により変化しなかった。(Fig. 8)。

以上の結果よりアンギオテンシンⅡとエンドセリンの刺激による総  $^{22}\text{Na}^+$  流入速度の上昇は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系を介する  $^{22}\text{Na}^+$  流入の増加のためと考えられた。

#### [SHRとWKYの血小板における細胞内pH]

血管平滑筋細胞のモデルとして用いた血小板の細胞内pHはSHRでWKYに比し有意に高値であった ( $7.12 \pm 0.02$  vs  $7.06 \pm 0.01$ ;  $P < 0.01$ ;  $n = 10$ ) (Fig. 9)。Fig. 10に示すようにH-7を添加するとSHR, WKYの血小板の細胞内pHはともに低下しはじめ約3分で定常状態に達した。

H-7添加時のSHRの血小板の細胞内pHは  $7.07 \pm 0.10$  でありWKYの  $7.02 \pm 0.08$  との間には有意差 ( $P < 0.01$ )があるもののH-7添加前のWKYのレベルにまで低下した。SHRではWKYに比しH-7添加により細胞内pHは、より顕著に低下した ( $0.06 \pm 0.01$  vs  $0.03 \pm 0.00$ ;  $P < 0.01$ ,  $n = 5$ )

(Fig. 11)。HA-1004の添加ではSHR、WKY共細胞内pHの低下はみられなかった(Fig. 10)。以上の結果をTableにまとめた。

#### 考 察:

本態性高血圧患者の赤血球内へのNaイオン流入の上昇があることについて数々の報告がなされてきた。1980年にCanessaらが本態性高血圧患者の赤血球内へのNaイオン流入上昇に対する $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ 交換系の関与を報告して以来(27)、高血圧患者や高血圧の家族歴を持つ正常血圧者の赤血球膜の $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ 交換活性の上昇が数々報告されるようになった(28)(29)(30)(31)。しかしながら、リチウムを負荷しない生理的な条件下の細胞では $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ 交換系は働かないことよりその交換系の生理的意義は疑問視されていた。1981年Kinsellaらが尿細管刷子縁膜の $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ の交換系が $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系と共通の担体からなる可能性がある



と報告し(32)、それまで  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  交換活性とされていたものが  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性を反映していると考えられるようになった。それ以来、高血圧の成因における  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系の関与の可能性が注目されるようになった。

赤血球や血小板、リンパ球において細胞容量の変化を測定する方法で  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性を評価し、本態性高血圧患者や SHR でその上昇がすでに報告されている(9)(10)(11)。一方血管平滑筋細胞は血球細胞に比し患者からの分離が困難であることより研究が遅れていた。1986年、Littleらは EIPA 感受性の  $^{22}\text{Na}^+$  の流入速度を用いて培養血管平滑筋細胞の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性が評価できること、そしてこの交換系が血管平滑筋細胞の重要な  $\text{Na}$  イオンの流入経路であることを報告した(14)。本研究では Littleらの方法を用いて SHR と WKY の培養血管平滑筋細胞における  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性を比較検討した。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系の阻害剤として用いた EIPA は、

従来、この系の阻害剤として用いられていた  
アミロライドの誘導体である。EIPAは血管平  
滑筋細胞において $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介する $\text{Na}^+$   
イオン流入をアミロライドの約1/100の量で同  
等に抑制し(14)、この濃度ではアミロライド  
と異なり $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交換系の阻害作用を有しな  
い(33)。ゆえに本実験ではEIPA感受性 $^{22}\text{Na}^+$   
流入をもって $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介する $^{22}\text{Na}^+$ 流  
入とし、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性を評価した。

EIPA感受性の $^{22}\text{Na}^+$ 流入速度はSHR培養血管  
平滑筋細胞でWKYのそれに比し有意に高値で  
あり $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系の活性上昇が示唆された。

前述の通り本態性高血圧患者やSHRの血球  
細胞で $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性が上昇しているという  
報告はあるが(9)(10)(11)、その機序につい  
ては十分には明らかにされていない。PK-Cを  
活性化するgrowth factorやアゴニストが $\text{Na}^+/\text{H}^+$   
交換活性を上昇させるという数々の報告  
があり(34)(35)(36)、PK-Cの活性上昇は細胞  
膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性を上昇させることが知ら



れている(37)。そこで今回、PK-Cの阻害薬であるH-7の $^{22}\text{Na}^+$ 流入に対する影響を検討した。H-7はSHRの培養血管平滑筋細胞において細胞内への $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を介するNaイオンの流入をWKYのコントロール値まで低下させたが、WKYでは有意な抑制は示さなかった。H-7は細胞膜透過性のPK-C阻害剤として有用であるがPK-Cに対する $K_i$ 値がcGMP-dependent protein kinase(Gキナーゼ)やcAMP-dependent protein kinase(Aキナーゼ)に対する $K_i$ 値に近いいためその特異性に問題があるとされている(18)。そこで今回の実験ではH-7と同じイソキノリン系薬剤であり、GキナーゼとAキナーゼに対する阻害効果はH-7と同等でしかもPK-Cに対する阻害効果をほとんど有しないHA-1004(20)をコントロールとして用いた。HA-1004はEIPA感受性 $^{22}\text{Na}^+$ に影響しなかったことよりSHRでのH-7による $^{22}\text{Na}^+$ 流入の減少はPK-Cの抑制によるものであると考えられた。

SHRのPK-C活性は血小板(38)および腎動脈

中膜組織(39)においてWKYに比し有意に高値であることが報告されている。したがって、SHRの $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性上昇にPK-C活性が、一部関与していることが示唆される。

PK-C非依存性に $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系を活性化する機構については未だ不明の点が多いが、Ca-calmodulin系やtyrosine kinaseの関与が考えられている(37)。細胞内Caイオンの上昇がCa-Calmodulin系を介して細胞内へのNaイオンの流入増大や $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の上昇をもたらすことが培養線維芽細胞について報告されている(40)(41)。平滑筋細胞に関しては、細胞内のCaイオン濃度は種々のアゴニスト刺激による $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の上昇に影響を与えるが、しかし単に細胞内のCaイオン濃度を上昇させCa-Calmodulin系を活性化するだけでは $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性は変化しないという報告がある(42)。本実験において、W-7添加によりcalmodulinを阻害してもEIPA感受性の $^{22}\text{Na}^+$ の流入には有意な変化はみられなかった。し



たがってラット培養血管平滑筋細胞については非刺激時の $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の調節にCa-calmodulinの関与は少ないと考えられた。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性の上昇は細胞内への $\text{Na}$ イオンの流入増大と細胞内のアルカリ化をもたらす。Blausteinは細胞内への $\text{Na}$ イオン流入は細胞内 $\text{Ca}$ イオンの重要な調節機構である細胞膜 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交換系を活性化すると述べている(43)(44)。培養血管平滑筋細胞についても細胞膜 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交換系の存在が証明されており(45)、ゆえに $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系の活性化は細胞内 $\text{Ca}$ イオンを増加させ血管のトーンスを上昇させる可能性がある。

一方、平滑筋細胞内pHの変化は筋収縮単位の $\text{Ca}$ イオンに対する感受性や細胞内への $\text{Ca}$ イオンの流入を変化させ血管のトーンスに影響すると言った数々の報告があり(46)また、血管平滑筋細胞の細胞内pHが低下するとアクトミオシン-アデノシントリフォスファターゼの活性が低下し平滑筋のトーンスが低下すると

いわれている(47)。本実験では平滑筋細胞のモデルとして血小板を用い、細胞内pHをpH感受性色素BCECF-AMを用いて測定した。血小板はその細胞内収縮機構が平滑筋細胞に類似しているため、平滑筋細胞の有用なモデル細胞としてしばしば用いられる(48)。細胞内pHは従来、pH電極、弱酸、弱塩基色素等を用いて測定していたが、測定感度や応答速度に問題があった。BCECF-AMはBCECFのカルボキシル基をアセトキシメチルエステル化したもので細胞膜透過性を有し、pHと蛍光強度との間にpH 6.4-7.6の範囲内で直線関係がみられ細胞内pHの測定に適している(24)。BCECF-AMを用いて測定した血小板の細胞内pHの値は以前に報告された血小板の細胞内pHにほぼ一致するものであり(23)、SHRでWKYに比し有意に高値であった。またSHRの血小板の細胞膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性は上昇しているとの報告があり(11)、SHR血小板の細胞内pH上昇は $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換活性上昇によるものと推測される。これらの結果



より SHR 培養血管平滑筋細胞における  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性の上昇は細胞内 pH を上昇させている可能性が考えられ、血管平滑筋細胞における  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性の上昇は細胞内への Na 流入増大だけでなく細胞内のアルカリ化を介しても血管の収縮をもたらす可能性がある。

さらに本実験では、強力な血管収縮性ペプチドとして知られるアンギオテンシン II とエンドセリン (49) のラット培養血管平滑筋細胞における  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性への作用を SHR と WKY で比較検討した。アンギオテンシン II、エンドセリン両ペプチドともに  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換活性を上昇させが、その刺激時の値は SHR で有意に高値であった。したがってこのことがアンギオテンシン II やエンドセリンによる SHR の血管管収縮反応の亢進 (50) (51) に一部関与している可能性が考えられる。

結 論:

- 1) SHR培養血管平滑筋細胞ではWKYに比しNaイオンの流入が増加しておりそれは細胞膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換系の活性上昇によるものと考えられた。
- 2) SHRの細胞膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換系の活性上昇にはprotein kinase Cが関与している可能性が示唆された。

なお本実験の一部は12th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension、第32回日本腎臓学会総会及び第11回日本高血圧学会総会において発表した。



謝 辞：

稿を終るにあたり、終始懇切な御指導を賜  
わった武田忠直教授、井上隆智助教授、金山  
良春講師、多くの有益な御助言をいただいた  
高折和男先生、岡村幹夫助手、根来伸夫助手  
他、教室員各位に厚く感謝いたします。

また、EIPAを分与して頂いた北陸大学、生  
理化学教室、毛利哲郎教授に厚く感謝いたし  
ます。



# REFERENCES

- 1) Losse, H., Wehmeyer, H., Wessels, F. Der Wasser-und Elektrolytgehalt von Erythrocyten bei arterieller Hypertonie. *Klin Wochenschr* 1960;38:393-395
- 2) Fadeke Aderounmu, A., Salako, L.A. Abnormal cation composition and transport in erythrocytes from hypertensive patients. *Eur J Clin Invest* 1979;9:369
- 3) Edmondson, R.P.S., Thomas, R.D., Hilton, P.J., Patrick, J., Jones, N.F. Abnormal leukocyte sodium composition and sodium transport in essential hypertension. *Lancet* 1975;1:1003-1005
- 4) Mahoney, J.R., Etkin, N.L., McSwigan, J.D., Eaton, J.W. Assessment of red cell sodium transport in essential hypertension. *Blood* 1982; 59:439-442
- 5) Harris, A.L., Guthe, C.C., van't Veer, F., Bohr, D.F. Temperature dependence and bidirectional cation fluxes in red blood cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1984;6: 42-48
- 6) Friedman, S.M., Nakashima, M., McIndoe, R.A. Glass electrode measurement of net Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes in erythrocytes of the spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55: 1302-1310
- 7) Walter, W., Distler, A. Abnormal sodium efflux in erythrocytes of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1982;4:205-210
- 8) Mahnensmith, R.L., Aronson, P.S. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 1985;56:773-788
- 9) Stokes, G.S., Monaghan, H.C., Marwood, J.F. The Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport in essential hypertension. *Lancet* 1987;27:1502
- 10) Feig, P.U., Docchio, M.A., Boylan, J.W. Lymphocytes membrane sodium-proton exchange in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987;9:282-288.
- 11) Livne, A., Balfe, J.W., Veitch, R., Marquez-Julio, A., Grinstein, S., Rothstein, A. Increased platelet Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange rates in essential hypertension application of a novel test. *Lancet* 1987; 7:533-536
- 12) Tamura, H., Hopp, L., Kino, M., Tokushige, A., Searle, B.M., Khalil, F., Aviv, A. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> regulation in cultured vascular smooth muscle cell of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1986;250:(cell physiol. 19) C939-C947
- 13) Matlib, M.A., Nabika, T., Wang, H., Nara, Y., Schwartz, A., Yamori, Y. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange across the cell membrane of vascular smooth muscle in WKY and SHR. *Circulation* 1983;68:Supp III-384
- 14) Little, P.J., Cragoe, E.J., Bobik, A. Na-H exchange is a major pathway for Na influx in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986;251 (Cell Physiol. 20 ):C707-C712.
- 15) Cragoe, E.J., Waltersdorf, O.W., Bicking, J.B., Kwong, S.F., Jones, J.H. Pyrazine diuretics II, N-amino-3-amino-5-substituted 6-halopyrazine carboxamides. *J Med Chem* 1967;10:66-75
- 16) Chamblley-Campbell, J., Campbell, G.R., Ross, R. The smooth muscle



- cell in culture. *Physiol Rev* 1979;59:1-61.
- 17) Orekhov, A.N., Andreeva, E.R., Krushinsky, A.V., Smirnov, V.N. Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta. *Med Biol* 1984;62:255-259
  - 18) Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y. Isoquinoline-sulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984; 23:495-499.
  - 19) Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., Endo, T., Ohno, S. Fujii, Y., Nagata, T. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981;78:4354-4357.
  - 20) Ishikawa, T., Inagaki, M., Watanabe, M., Hidaka, H. Relaxation of vascular smooth muscle by HA-1004, an inhibitor of cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 235:495-499.
  - 21) Wroblewski, F., Ladue, S.L. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;90:210-213.
  - 22) Bradford, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
  - 23) Siffert, W., Siffert, G., Scheid, P. Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human platelets stimulated by thrombin and phorbol ester. *Biochem J* 1987;241:301-303
  - 24) Rink, R.J., Tsien, R.Y., Pozzan, T. Cytoplasmic pH and free Mg in lymphocyte. *J Cell Biol* 1982;95:189-196
  - 25) Horne, W.C., Norman, N.E., Schwarz, D.B., Simons, E.R. Changes in cytoplasmic pH and in membrane potential in thrombin-stimulated human platelets. *Eur J Biochem* 1982;120:295-302
  - 26) Rosoff, P.M., Cantley, L.C. Stimulation of the T3-T cell receptor-associated Ca<sup>2+</sup> influx enhances the activating of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in a leukemic human T cell line. *J Biol Chem* 1985;260:14053-14059
  - 27) Canessa, M., Adragna, N., Solomon, H., Connolly, T.M., Tosteson, D.C. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1980;302:772-776
  - 28) Aronson, P.S., Red cell sodium lithium countertransport and essential hypertension. *N Engl J Med* 1982;307:317
  - 29) Burgnara, C., Corrocher, R., Foroni, L., Steinmayr, M., Bonfanti, F., De Sandre, G. Lithium-sodium counter transport in erythrocytes of normal and hypertensive subjects: relationship with age and plasma renin activity. *Hypertension* 1983; 5: 529-534
  - 30) Canali, M., Borghi, L., Sani, E. Increased erythrocytes lithium-sodium countertransport in essential hypertension: its relationship to family history of hypertension. *Clin Sci* 1981;61: 13-15
  - 31) Ibsen, K.K., Jensen, H. A., Wieth, J.O., Funder, J. Essential hypertension: sodium-lithium countertransport in erythrocytes from patients and from children having one hypertensive parent.



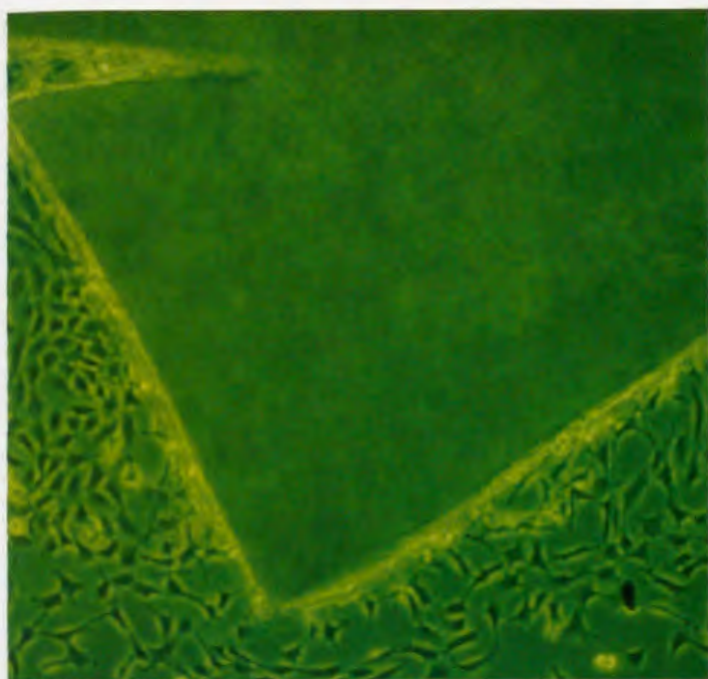
- Hypertension 1982;4:703-709
- 32) Kinsella, J.L., Aronson, P. Interaction of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Li}^+$  with the renal microvillus membrane  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchanger. *Am J Physiol* 1981; 241(Cell Physiol. 10):C220-C226.
  - 33) Kaczorowski, G.J., Barros, F., Dethmers, J.K., Trumble, M.J. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in pituitary plasma membrane vesicle by analogues of amiloride. *Biochemistry* 1984;24:1394-1403
  - 34) Siffert, W., Scheid, P. A phorbol ester and 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol induce  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;141: 13-19
  - 35) Little, P.J., Weissberg, P.L., Cragoe, E.J., Bgobic, A. Sodium-hydrogen exchange in vascular smooth muscle: regulation by growth factors. *J Hypertension* 1987;Supp-5:277-279
  - 36) Owen, N.E. Effect of catecholamine on  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1986;103:2053-2060
  - 37) Grinstein, S., Rithstein, A. Mechanisms of regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *J Membrane Biol* 1986;90:1-12
  - 38) Takaori, K., Itoh, S., Kanayama, Y., Takeda, T. Protein kinase C activity in platelets from spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY). *Biochem Biophys Res Commun* 1986;141:769-773.
  - 39) Silver, P.J., Leopre, R.E., Cumiskey, W.R., Kiefer, D., Harris, A.L. Protein kinase C activity and reactivity to phorbol ester in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY). *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:272-277.
  - 40) Owen, N.E., Villereal, M.L. Evidence for a role of calmodulin in serum stimulation of  $\text{Na}^+$  influx in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1982;79:3537-3541
  - 41) Ober, S.S., Pardee, A.B. Both protein kinase C and calcium mediated activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in chinese hamster embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 1987;132:311-317
  - 42) Mistuhashi, A., Ives, H.E. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  requirement for activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1988;263:8790-8795
  - 43) Blaustein, M.P. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: reassessment and a hypothesis. *Am J Physiol* 1977;232:C165-C173.
  - 44) Blaustein, M.P. Sodium transport and hypertension. Where are we going. *Hypertension* 1984;6:445-453.
  - 45) Nabel, E.G., Berd, C.B., Brock, T.A., Smith, T.W.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62:486-493
  - 46) Wray, S. Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function. *Am J Physiol* 1988;254(Cell Physiol. 23):C213-C225
  - 47) Murwa, V., Acting, I., Ruegg, J.C. Influences of calcium concentration and pH on the tension development and ATPase of the arterial actomyosin contractile system. *Blood Vessels* 1974;11: 277-286.
  - 48) Erne, P., Resink, T.J., Burgisser, E., Buhler, F.R. Platelets and



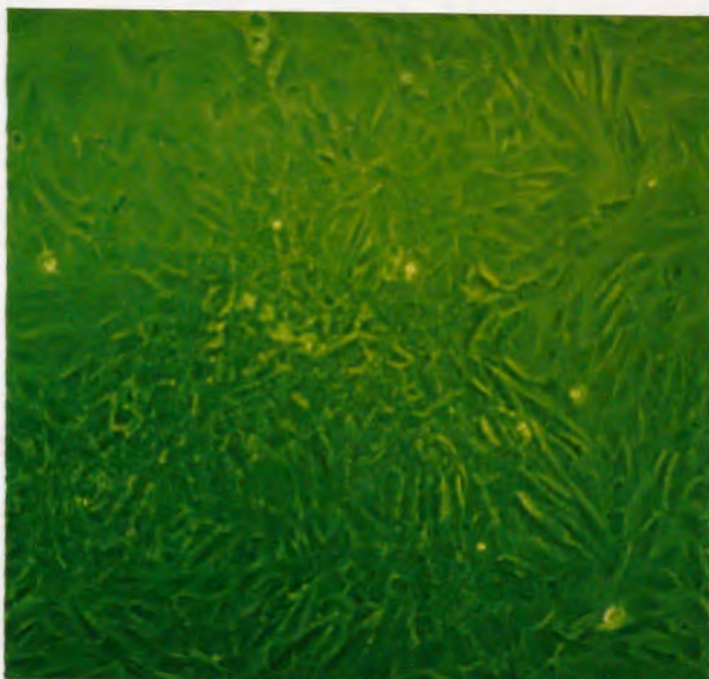
- hypertension. J Cardiovasc Pharmacol 1985;7 Supp-6:103-108
- 49) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, M., Goto, K., Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411-415
- 50) Tomobe, Y., Miyauchi, A. Yanagisawa, M, Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. Effects of endothelin on the renal artery from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. Europ J Pharmacol 1988;152:373-374
- 51) Watanabe, T., Kumagaya, S., Nishino, H., Nakajima, K., Kimura, T., Sakakibara, S. Effects of endothelin-1 and endothelin-3 on blood pressure in conscious hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol 1989;13 Supp-5:207-208



a)



b)



c)

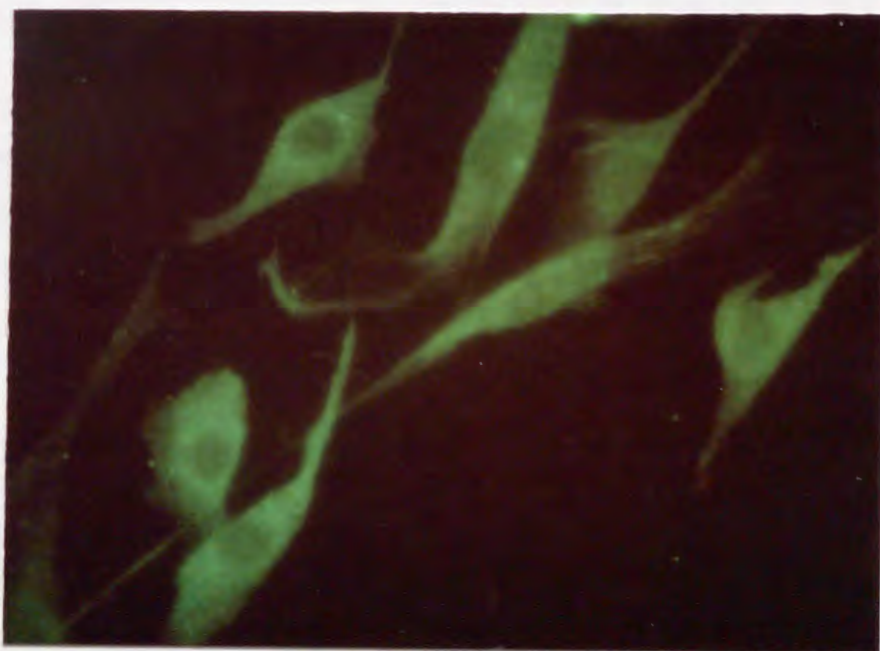


Fig.1 a) Phase-contrast micrograph of vascular smooth muscle cells migrated from tunica media of rat thoracic aorta. X100  
b) Characteristic "hill-and-valley" growth pattern of smooth muscle cells from rat aorta. X100  
c) A fluorescent micrograph of the rat aortic cells stained with anti-muscle actin IgG. X400



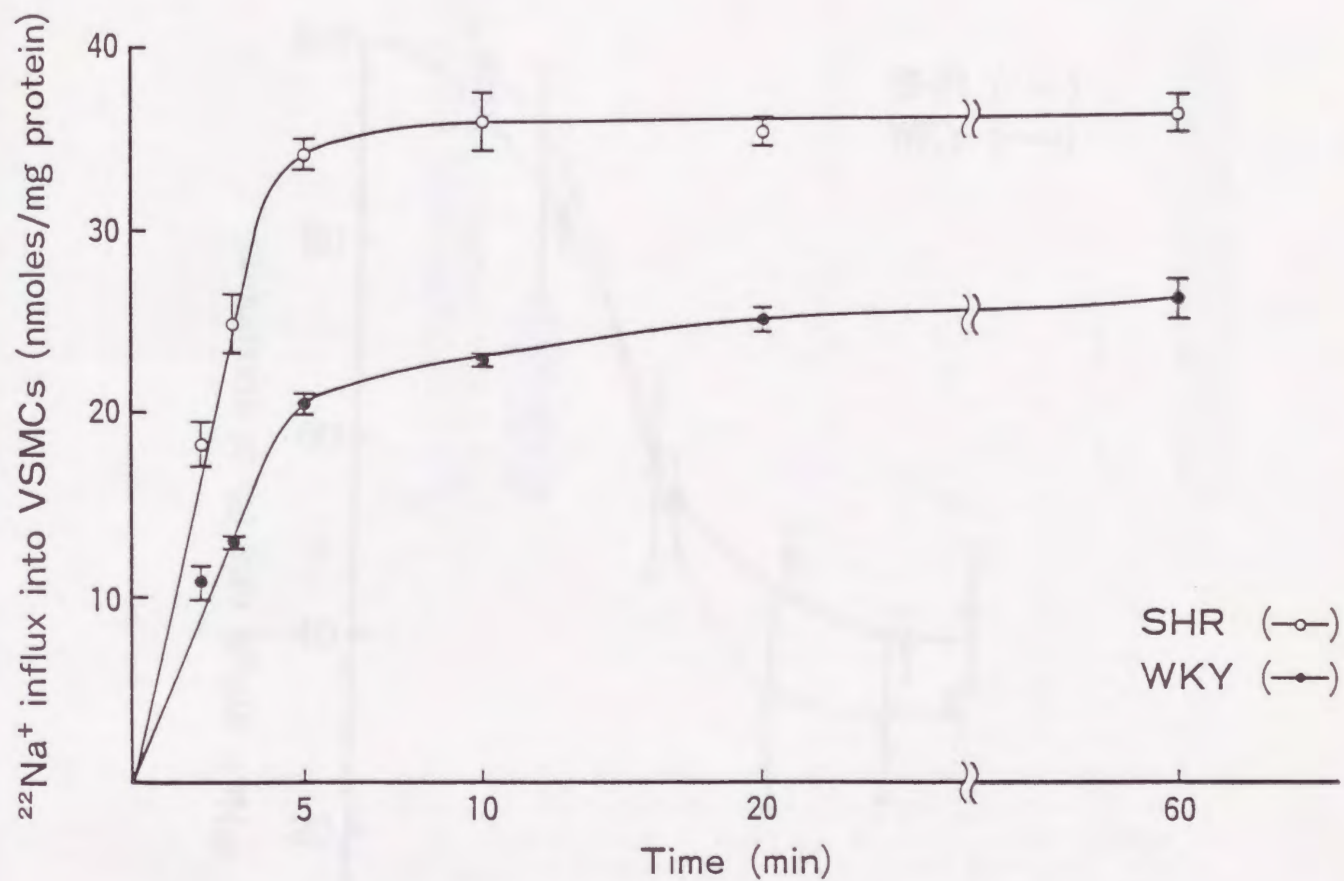


Fig.2 Time course of  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into cultured vascular smooth muscle cells from SHR and WKY. Cells were preincubated in Na-free PSS as described in materials and methods. Influx media contained 15mM  $\text{Na}^+$  balanced isoosmotically with choline chloride. Values are mean  $\pm$  SE of triplicated determination.

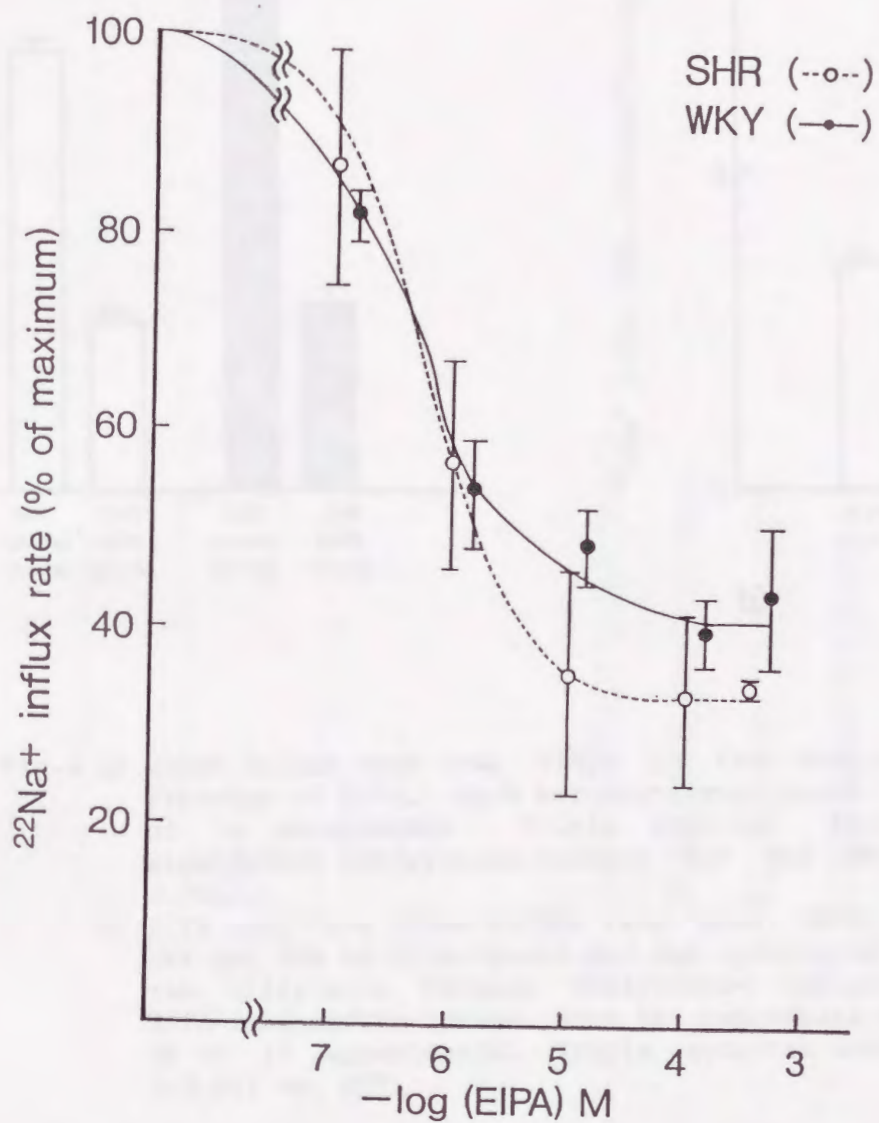


Fig.3 Inhibition of  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from WKY and SHR by EIPA.  $^{22}\text{Na}^+$  influx rates were measured during a 5 min incubation at  $37^\circ\text{C}$  in PSS containing  $15\text{mM Na}^+$  and ouabain. Results are means  $\pm$  SE of 3 experiments.



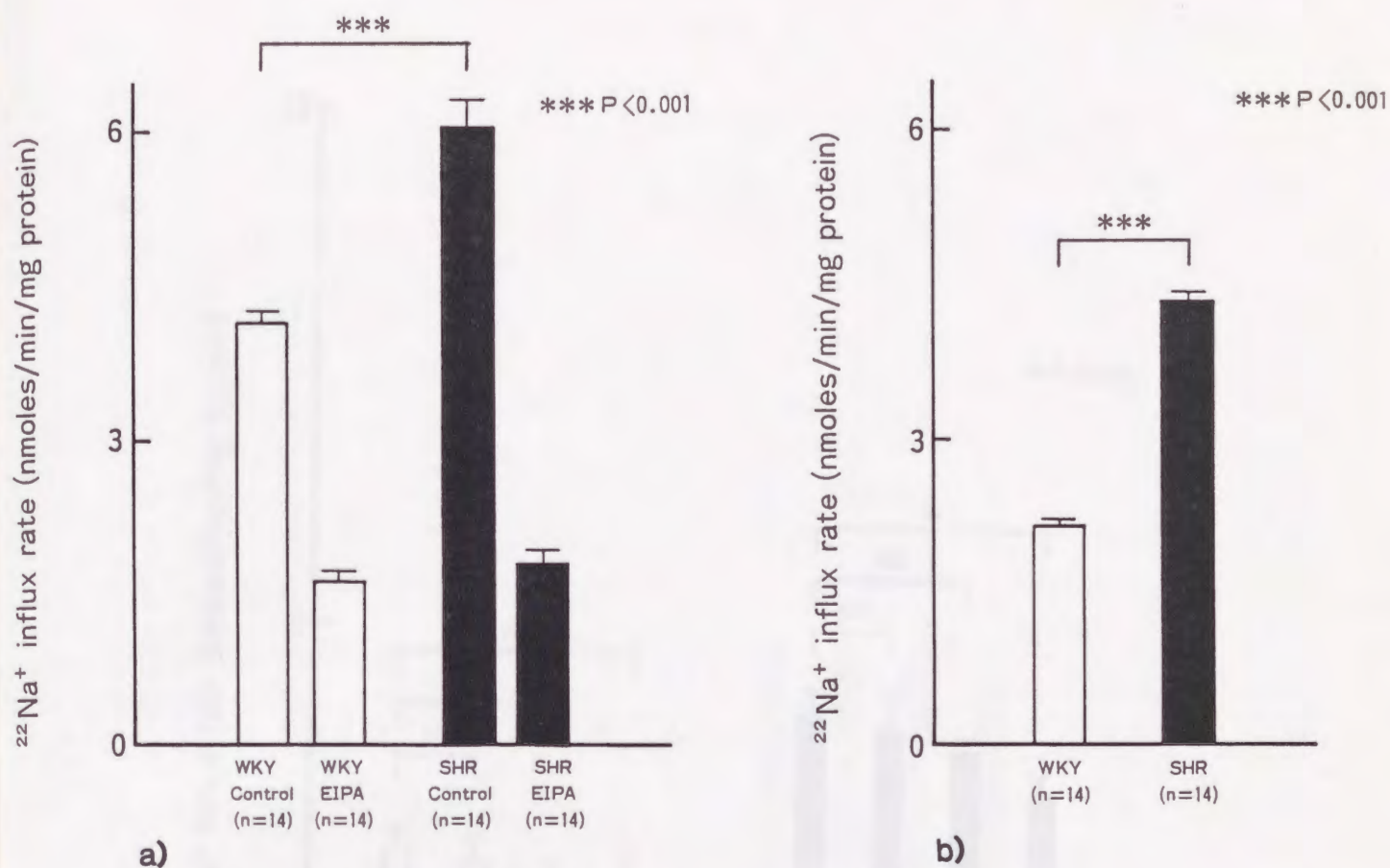


Fig.4 a)  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs in the absence or presense of EIPA. Each bar represents means  $\pm$  SE of 14 experiments. Triple asterisk indicates significant differences between SHR and WKY ( $P < 0.001$ ).

b) EIPA sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from WKY and SHR is illustrated and was calculated from the difference between total- $^{22}\text{Na}^+$  influx and EIPA-insensitive influx. Each bar represents mean  $\pm$  SE of 14 experiments. Triple asterisk indicates  $P < 0.001$  vs. WKY.

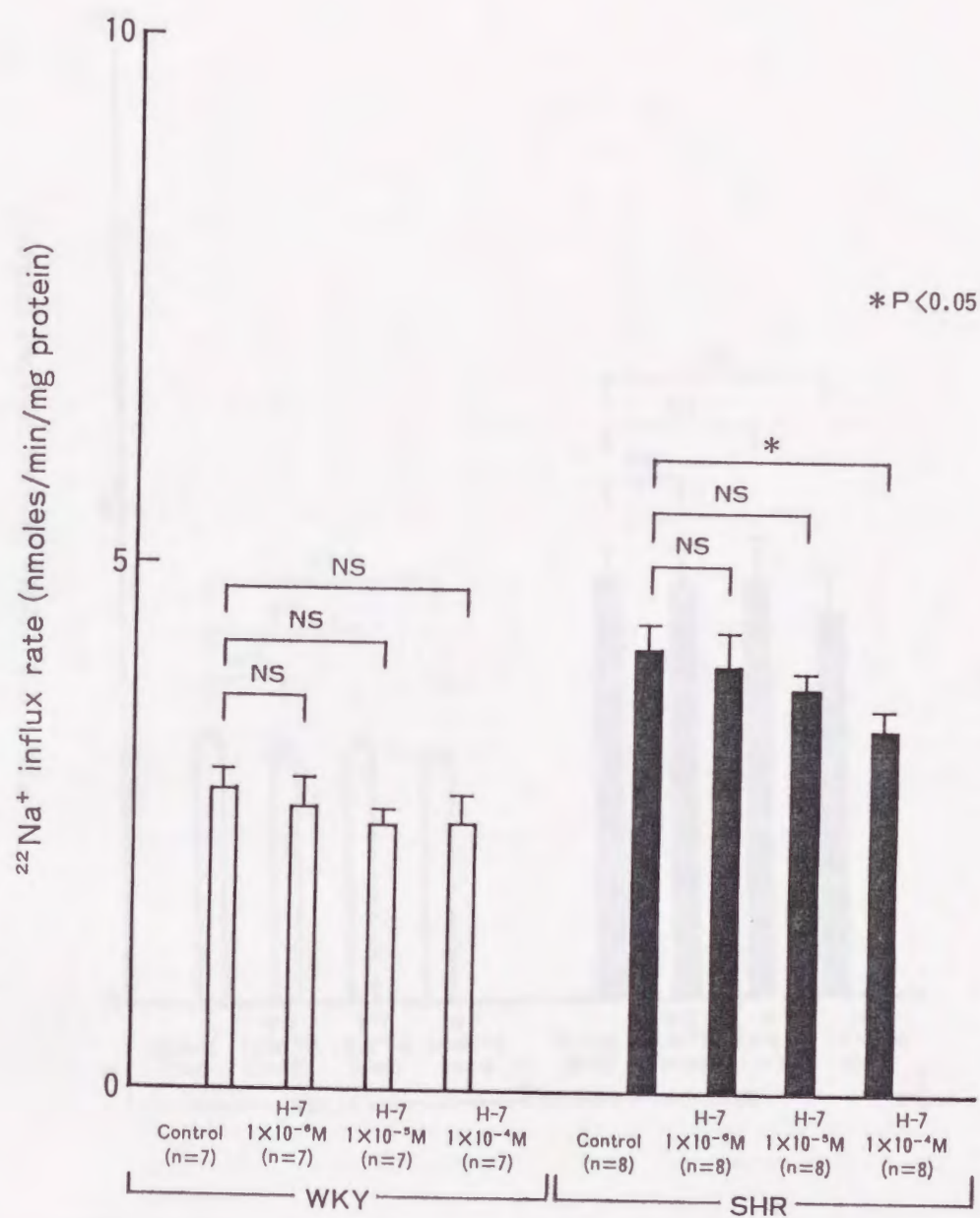


Fig.5 Effects of H-7 on EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from WKY and SHR. EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate in the absence or presence of H-7 ( $1 \times 10^{-6}\text{M}$  -  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) was illustrated. Each bar represents mean  $\pm$  SE of the number of observations at the bottom of each column. Single asterisk indicates  $P < 0.05$  vs. control of SHR. NS=not significant.



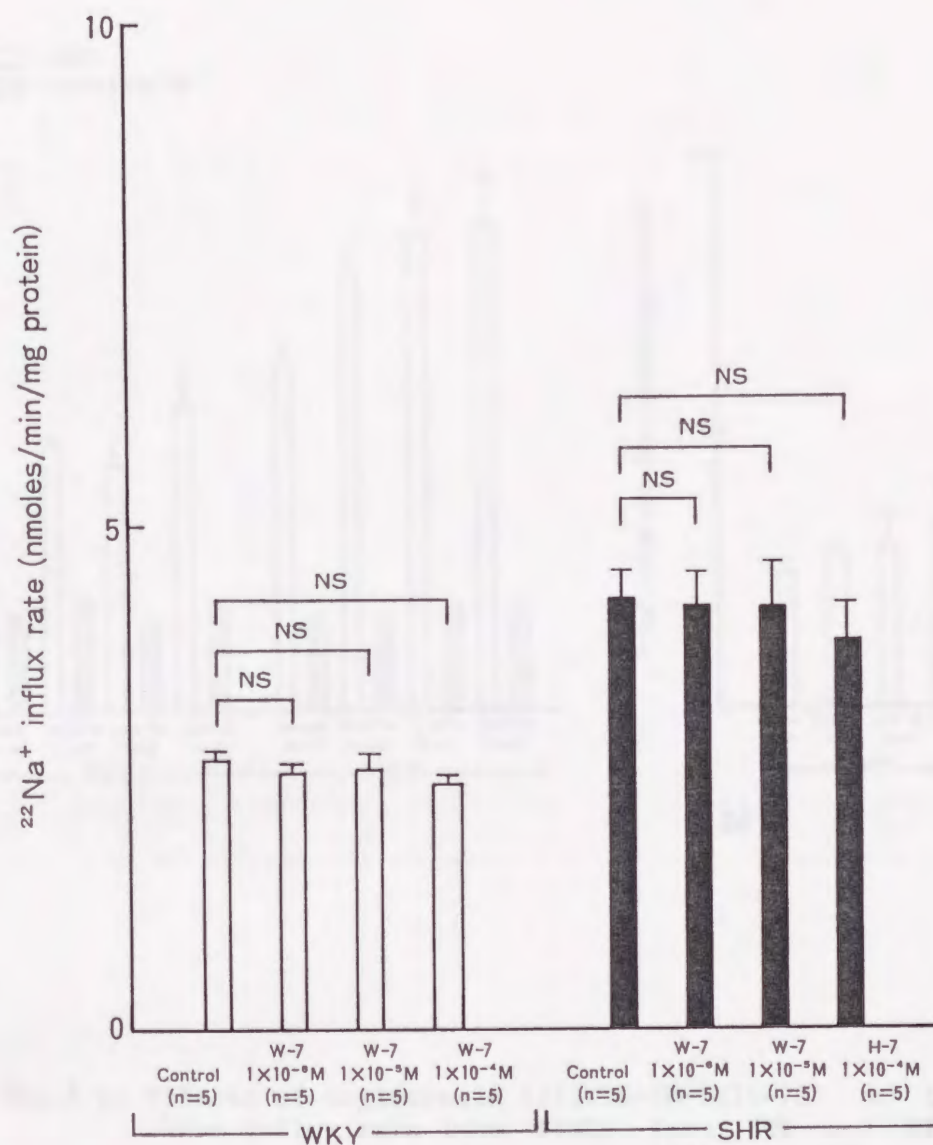
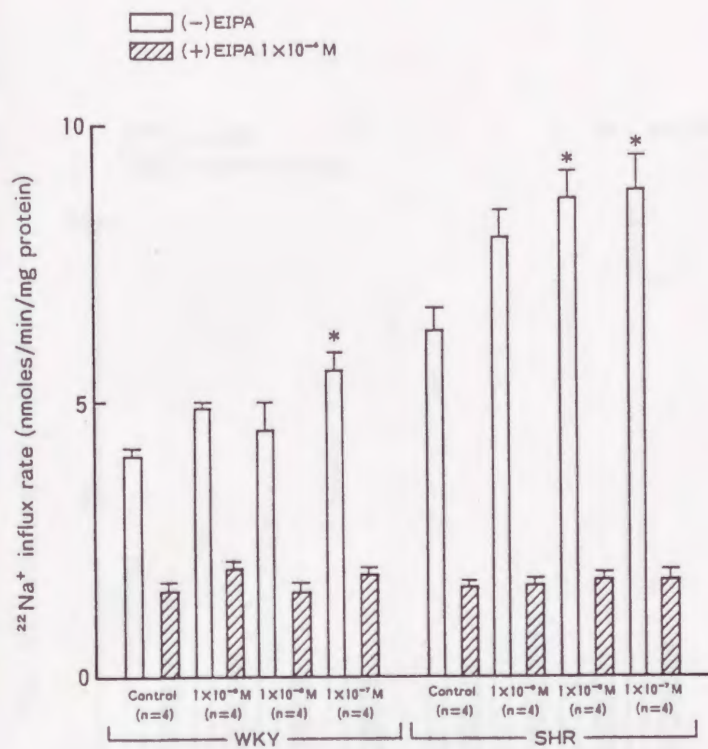
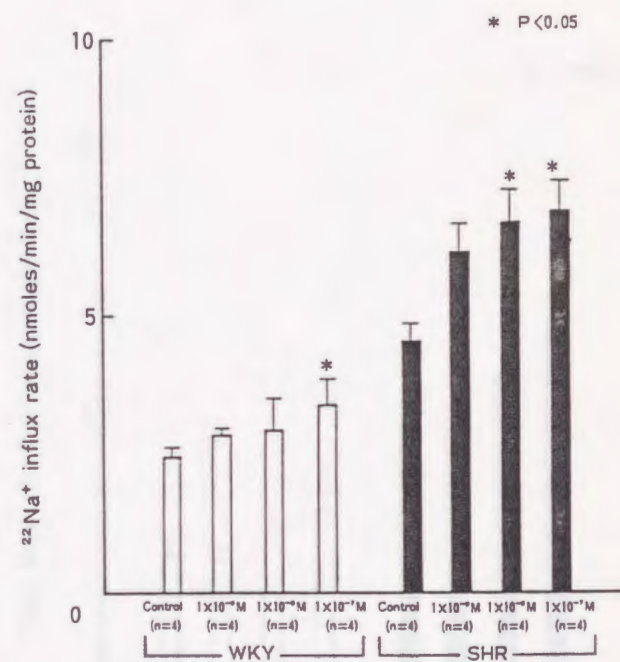


Fig.6 Effects of W-7 on EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from WKY and SHR. EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate in the absence or presence of W-7 ( $1 \times 10^{-6}\text{M}$ –  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) was illustrated. Data are mean  $\pm$  SE for 5 experiments. NS=not significant.



a)



b)

Fig.7 a) Effects of angiotensin II( $1 \times 10^{-9}$ M- $1 \times 10^{-7}$ M) on the  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from SHR and WKY. Single asterisks indicate significant differences from the control( $P < 0.05$ ). Data are mean  $\pm$  SE for 4 experiments.

b) Effects of angiotensin II on EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from SHR and WKY. Single asterisks indicate significant differences from the control( $P < 0.05$ ). Data are mean  $\pm$  SE for 4 experiments.



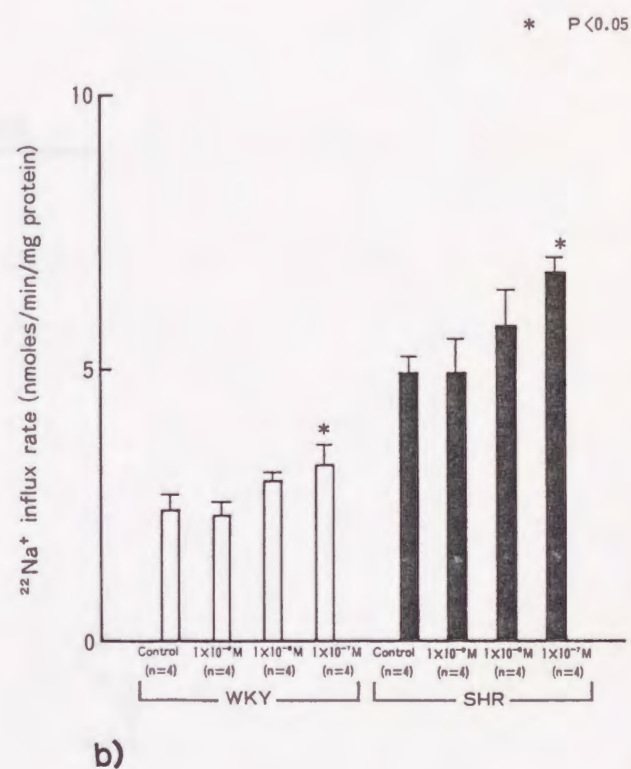
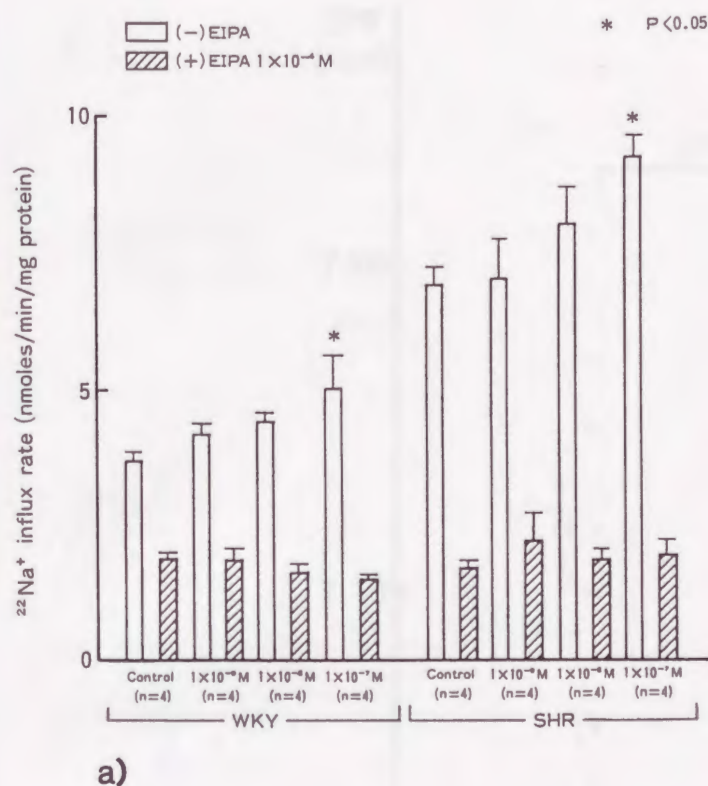


Fig.8 a) Effects of endothelin-3 ( $1 \times 10^{-9}$  M- $1 \times 10^{-7}$  M) on total and EIPA insensitive- $^{22}\text{Na}^+$  influx rate into VSMCs from WKY and SHR. Single asterisks indicate  $P < 0.05$  vs. control. Data are mean  $\pm$  SE for 4 experiments.

b) Effects of endothelin-3 of EIPA-sensitive  $^{22}\text{Na}^+$  influx rate. Single asterisks indicate  $P < 0.05$  vs. control. Data are mean  $\pm$  SE for 4 experiments.

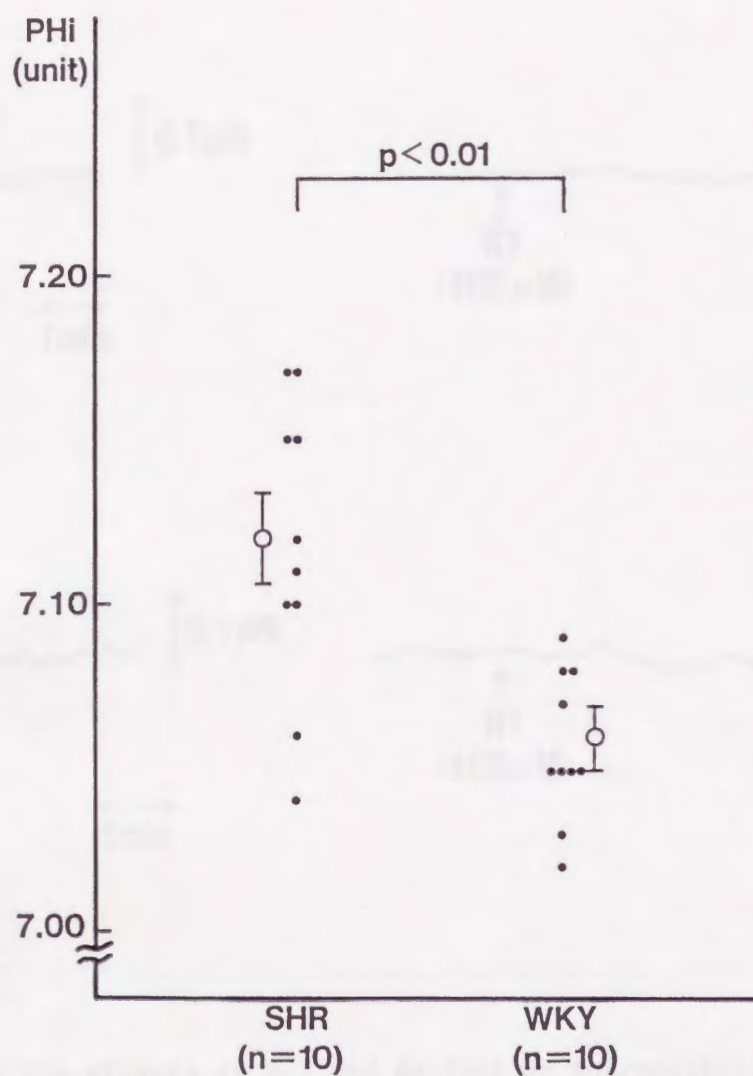
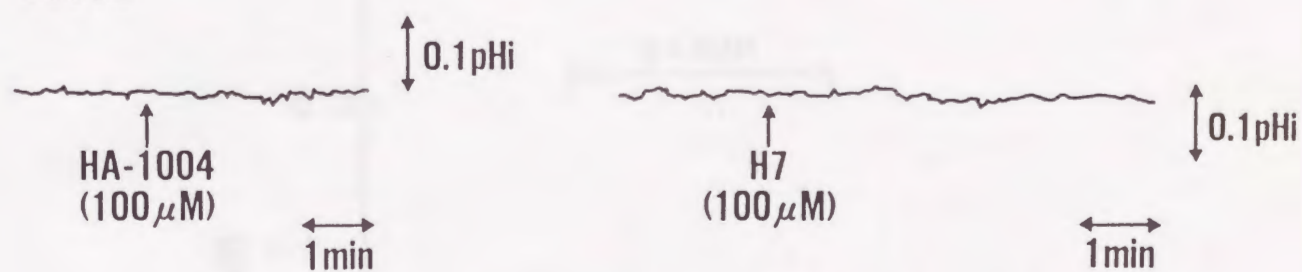


Fig.9 Intracellular pH in platelets from SHR and WKY. Each bar represents mean  $\pm$  SE of 10 experiments.



WKY



SHR

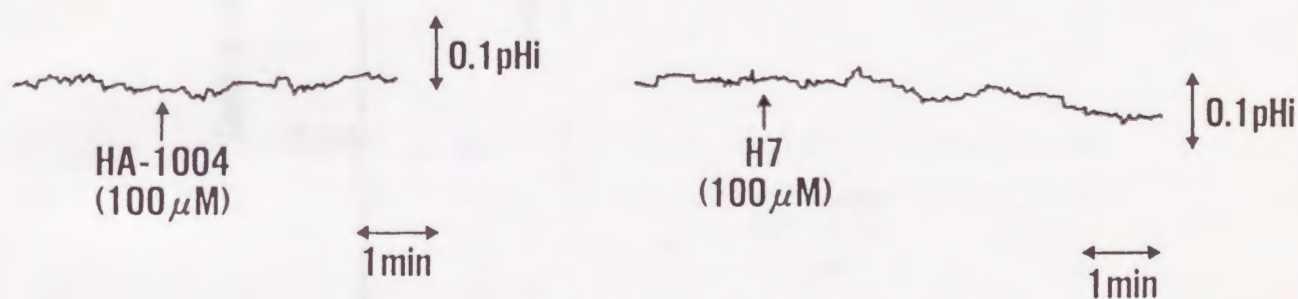


Fig.10 The effects of H-7 and HA-1004 on intracellular pH in platelets from WKY and SHR. BCECF-loaded platelets were maintained in HEPES buffer, pH-7.4, and where indicated by the arrow, each agent was added. The addition of H-7(100 $\mu$ M) to platelets from both WKY and SHR caused a fall in intracellular pH that leveled off in about 3 min. HA-1004 failed to alter intracellular pH in platelets from WKY and SHR.

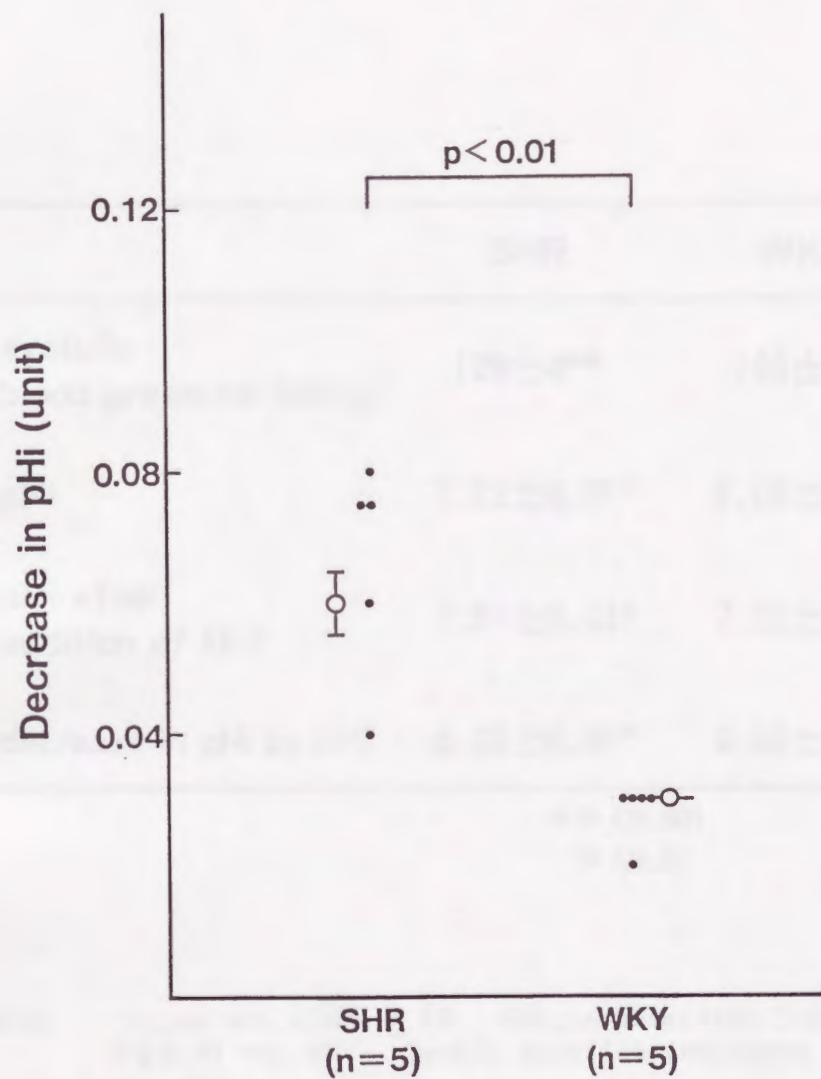


Fig.11 Decreases in intracellular pH in platelets from SHR and WKY induced by H-7(100 $\mu$ M). Each bar represents mean  $\pm$  SE of 5 experiments.



|                                   | SHR        | WKY       |
|-----------------------------------|------------|-----------|
| systolic<br>blood pressure (mmHg) | 179±4**    | 148±3     |
| pHi                               | 7.12±0.01* | 7.06±0.01 |
| pHi after<br>addition of H-7      | 7.07±0.01* | 7.02±0.01 |
| decrease in pHi by H-7            | 0.06±0.01* | 0.03±0.00 |
| ** <0.001                         |            |           |
| * <0.01                           |            |           |

Table Values are means  $\pm$  SE. Single asterisks indicate  $P < 0.01$  vs. WKY. Double asterisk indicates  $P < 0.001$  vs. WKY.